Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DER EINFLUSS VON RIFAMPICIN AUF DIE ARZNEIMITTELABBAUENDEN ENZYME DER LEBER VON MEERSCHWEINCHEN UND RATTE.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Fritz Stohrer
aus Göppingen
1978

Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DER EINFLUSS VON RIFAMPICIN AUF DIE ARZNEIMITTELABBAUENDEN ENZYME DER LEBER VON MEERSCHWEINCHEN UND RATTE.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Fritz Stohrer
aus Göppingen
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof.Dr.med. H.J.Mallach

Berichterstatter: Prof.Dr.med. H.Remmer

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methodik	2
2.1.	Vorbehandlung der Tiere	2
2.2.	Gewinnung der Mikrosomenfraktion	2
2.3.	In vitro-Bestimmungen	3
2.3.1.	Bestimmung des mikrosomalen Proteins	3
2.3.2.	Messung von Cytochrom b-5 u. P 450	3
2.3.3.	Bestimmung von NADPH-Cytochrom C-Reduktase	4
2.3.4.	P-Hydroxylierung von Anilin	4
2.3.5.	Demethylierung von Äthylmorphin	5
2.3.6.	Demethylierung von p-Nitroanisol	5
2.3.7.	Aromatische Hydroxylierung von 2, 4, 6, 7-^{3}H Äthinylöstradiol	6
2.3.8.	Hexobarbitalbindungsspektrum mit mikrosomalen Cytochromen	8
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Ergebnisse der Versuche mit Meerschweinchen	9
3.2.	Ergebnisse der Versuche mit Wistar-Ratten	10
4.	Diskussion	11
5.	Zusammenfassung	14
6.	Tabellen	15
6.1.	Tabelle 1: 1. Versuchsserie mit Meerschweinchen	15
6.2.	Tabelle 2: 2. Versuchsserie mit Meerschweinchen	16
6.3.	Tabelle 3: Versuchsserie mit Wistar-Ratten	17
6.4.	Tabelle 4: Gewichtstabelle	18
7.	Literatur	19

1. Einleitung

Rifampicin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Rifamycine, das nach BINDA et al. (1) die an der Transkription beteiligte bakterielle RNA-Polymerase hemmt u. somit die RNA-Synthese. In die Behandlung der Tuberkulose hat es in Kombination mit anderen Tuberkulostatika (Streptomycin, Isoniazid, Ethambutol etc.) Eingang gefunden.

Im Laufe der Zeit wurde über Wirkungsinterferenzen zwischen Rifampicin u. anderen Arzneimitteln Erfahrungen gesammelt. So berichtete MICHOT u. Mitarb. (8) erstmals, daß bei Patienten, die unter Antikoagulantientherapie standen, nach mehrtägiger Rifampicingabe eine Erhöhung der Antikoagulantiendosis notwendig wurde, um die erwünschte Gerinnungshemmung zu gewährleisten. Großes Interesse fand dann eine Studie von NOCKE-FINCK u. Mitarb. (11), die zeigte, daß bei 88 Patientinnen unter Rifampicin-Behandlung u. oraler Kontrazeption fünf Schwangerschaften auftraten.

REMMER et al. (16) zeigten in einer Untersuchung, daß Rifampicin bereits im therapeutischen Dosierungsbereich die arzneimittelabbauenden Enzyme vermehrt. H.M. BOLT, H. KAPPUS u. M. BOLT (3) legten Daten vor, nach denen im untersuchten Leberpunktat von Patienten unter Rifampicin-Behandlung die Hydroxylierungsrate von Östradiol u. Äthinylöstradiol um das Vierfache gesteigert war. Das mikrosomale Cytochrom P 450 stieg parallel dazu an.

Diese Ergebnisse, gewonnen durch Selbstversuche u. anhand von Mikrosomenfraktionen aus Leberpunktat mit Rifampicin behandelter Patienten, legten nahe, die Wirkung des Rifampicin auf mikrosomale Enzymstrukturen an verschiedenen Tierspezies zu untersuchen.

Nachdem JEZEQUEL et al. (6) bei vergleichenden elektronenmikroskopischen Studien von Hepatocyten mit Rifampicin behandelter Menschen u. Meerschweinchen eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums gefunden hatten, wurden Meerschweinchen u. Ratte für die Versuche als geeignete Tierspezies angesehen.

2. Methodik

2.1. Vorbehandlung der Tiere

Für die Versuche wurden weibliche Meerschweinchen (310-350 gr. Kgew.) u. männliche Wistar-Ratten (180-220 gr. Kgew.) verwandt.
Die Meerschweinchen wurden mit Rifampicin sechs Tage mit einer Dosis von 10, 25, u. 50 mg/kg Kgew. vorbehandelt. Bei einem Versuch mit 50 mg/kg Kgew. wurde nur drei Tage vorbehandelt. Die Wistar-Ratten erhielten 25 u. 50 mg/kg Kgew. sechs Tage lang.
Das Rifampicin (Grünenthal, Deutschland) wurde in Aqua dest. suspendiert u. mit einer genügenden Menge vier N NaOH aufgelöst. Diese alkalische Lösung wurde den Tieren mit einer Magensonde verabreicht. Zwei Tage nach der letzten Sondengabe wurden die Tiere geschlachtet.

2.2. Gewinnung der Mikrosomenfraktion

Die Mikrosomenpräparation wurde entsprechend der von REMMER u. Mitarb. (17) beschriebenen Standardmethode vorgenommen.
Nach Dekapitieren u. Ausbluten der Tiere bestimmte ich das Lebergewicht u. homogenisierte die bereits zerkleinerte Leber in eiskalter SVT-Pufferlösung nach STAUDINGER u. LEYBOLD (19). Dieses Homogenat wurde bei 0^{o} C in der Kühlzentrifuge mit 10 000 Upm (7000 g) 10 Min. zentrifugiert u. der Überstand im Rotor 50 der Spinco-Ultrazentrifuge bei 40 000 Upm (105 000 g) 60 Min. zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen nahm ich in 12 ml SVT-Pufferlösung auf u. zentrifugierte sie nach zweimaligem Homogenisieren nochmals 60 Min. bei 40 000 Upm. Das dann gewonnene rote Pellet wurde so in SVT-Pufferlösung aufgenommen u. homogenisiert, daß auf 1 ml mikrosomale Lösung 0,25 gr Leber kamen.

Mit der Mikrosomenfraktion jedes einzelnen Tieres bestimmte ich noch am selben Tag Cytochrom P 450 u. b-5,

die NADPH-Cytochrom C-Reduktase, die Demethylierungsrate von p-Nitroanisol u. nahm die Inkubation für die P-Hydroxylierung des Anilins, die Demethylierung des Äthylmorphins u. die aromatische Hydroxylierung des 2, 4, 6, 7-^{3}H Äthinylöstradiols vor.

2.3. In vitro-Bestimmungen

2.3.1. Bestimmung des mikrosomalen Proteins

Nach der Methode von LOWRY et al. (7) versetzte ich 10 ul mikrosomale Lösung mit 0,5 ml 1 N NaOH, 0,5 ml H_2O u. 5 ml alkalischem Kupfersulfat-Reagenz u. ließ den Ansatz bei Raumtemperatur stehen. Genau 10 Min. danach gab ich 0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz hinzu, die unmittelbar vor der Verwendung 1:1 mit aqua dest. verdünnt worden war. 30 Min. später bestimmte ich mit dem Zeiss-Spektrophotometer bei 720 nm gegen einen nach derselben Methode behandelten Nullwert die Extinktion. Mit Rinderserumalbumin wurde eine Eichkurve hergestellt, die zur Umrechnung von Extinktionswerten auf Proteinkonzentrationen diente. Bei jeder Bestimmungsreihe wurde ein Rinderserumalbumin-Standard zur proportionalen Angleichung der ermittelten Extinktionswerte an die Eichkurve mitgeführt.

2.3.2. Messung von Cytochrom b-5 u. P ^{450}

Nach der Arbeit von OMURA u. SATO (12) wurde 0,5 ml Mikrosomensuspension, die wegen der zu hohen Proteinkonzentration im Verhältnis 1:1 mit SVT-Pufferlösung verdünnt worden war, u. 1,5 ml SVT-Pufferlösung in Vergleichs- u. Meßküvette gegeben u. die Reaktion nach Zugabe von 10 ul NADH (10 mg/0,5 ml) in die Meßküvette gestartet u. im Bereich von 380-500 nm das Differenzspektrum im Unicam-Spektrophotometer SP 1800 gemessen. Zuvor registrierte ich die Nullinie im Meßbereich. Nach dieser Messung des Cytochrom b-5 leitete ich 20 sec lang CO-Gas in die Meßküvette, reduzierte den Ansatz in beiden Küvetten mit einigen Körnchen Natriumdithionit, mischte

vorsichtig u. schrieb das Differenzspektrum zwischen 380-500 nm mit. Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten (185 cm^{-1} mM^{-1} für Cytochrom b-5 u. 91 $cm^{-1}mM^{-1}$ für Cytochrom P450) u. der Extinktionsdifferenz (bei Cytochrom b-5: dE_{424}- dE_{410} nm; bei Cytochrom P 450: dE_{450}- dE_{500} nm),korrigiert um die Differenz der Werte zur Nullinie, berechnete ich Cytochrom b-5 u. P 450 in nMol/mg Protein.

2.3.3. Bestimmung von NADPH-Cytochrom C-Reduktase

Nach den Angaben von WILLIAMS u. KAMIN (21) verwandte ich folgenden Inkubationsansatz:

0,3 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,5
0,3 ml Cytochrom C (5 mg/ml)
0,3 ml Natriumcyanid (3mM)
0,1 ml Mikrosomensuspension
2 ml H_2O

Die Reaktion startete ich bei 37°C mit der Zugabe von 10 ul NADPH (10 mM) in die Meßküvette nach 5 Min. Vorinkubation. Die Reduktion des Cytochrom C wurde bei 550 nm im Unicam-Spektrophotometer SP 1800 gemessen gegen die Vergleichsküvette u. aus dE/min u. dem molaren Absorptionskoeffizienten (21,0 cm^2 $uMol^{-1}$) die NADPH-Cytochrom C-Reduktase in uMol/mg Prot./min bestimmt.

2.3.4. P-Hydroxylierung von Anilin

Die Inkubation wurde in Eppendorf-Mikrogefäßen durchgeführt:

0,1 ml Anilin (0,16 M)
0,1 ml $MgCl_2$ (0,05 M)
0,1 ml Isocitrat (0,08 M)
0,3 ml Tris-HCl-Puffer (0,25 M) pH 7,5
0,3 ml Mikrosomensuspension
5 ul Isocitrat-Dehydrogenase (Fa. Boehringer)

Nach fünf Min. Vorinkubation im Wasserbad bei 37° C wurde die Reaktion mit 0,1 ml NADP-Na (0,01 M) gestartet.

Nach 5, 10 u. 20 Min. entnahm ich jeweils 0,3 ml u. stoppte die Reaktion in 0,3 ml 15 %iger Trichloressigsäure. Im Kühlschrank aufbewahrt zentrifugierte ich am darauffolgenden Tag das präzipitierte Protein ab, bestimmte mit 0,5 ml des Überstandes, 0,5 ml Phenolreagenz (5 % Phenol in 0,25 N NaOH) u. 0,5 ml 1 M Na_2CO_3-Lösung nach 30 Min. bei 630 nm mit dem Zeiss-Spektrophotometer die Extinktion u. errechnete mit dem aus der Eichkurve ermittelten Faktor (E_{630} 0,1 = 20,6 nMol Aminophenol) das gebildete Aminophenol in nMol/mg/min, wie von SCHENKMAN, REMMER u. ESTABROOK (18) beschrieben.

2.3.5. Demethylierung von Äthylmorphin

Sie wurde erfaßt durch die Messung des erzeugten Formaldehyds nach den Angaben von NASH (9):

0,1 ml Äthylmorphin (0,05 M)
0,1 ml $MgCl_2$ (0,05 M)
0,1 ml DL-Na-Isocitrat (0,08 M)
0,3 ml Tris-HCl-Puffer (0,25 M) pH 7,5
0,3 ml Mikrosomensuspension
5 ul Isocitrat-Dehydrogenase

Dieser Ansatz wurde gemischt u. bei 37° C fünf Min. vorinkubiert. Mit 0,1 ml 10 mM NADP-Na wurde die Reaktion gestartet. 0,3 ml wurden dem Inkubat 3, 6, 9 Min. nach dem Start entnommen u. in 0,3 ml 7,5 %iger Trichloressigsäure ausgefällt. Am anderen Tag wurde, nachdem das Protein abzentrifugiert war, 0,5 ml des Überstandes, 0,5 ml Nash-Reagenz u. 1,0 ml H_2O bei 58° C im Wasserbad 12 Min. erwärmt u. dann im Zeiss-Spektrophotometer bei 412 nm die Extinktion gemessen. Graphisch ermittelte ich den Umsatz dE/min u. mit dem Faktor aus der Eichkurve (E_{412} von 0,1 = 49,3 nMol Formaldehyd) errechnete ich den Umsatz in nMol/mg Prot./min.

2.3.6. Demethylierung von p-Nitroanisol

Nach der von NETTER u. SEIDEL beschriebenen Methode (10)

wurde folgender Standardansatz verwendet:

0,5 ml p-Nitroanisol (2mM) u. $MgCl_2$ (50 mM)
0,5 ml DL-Na-Isocitrat (80mM)
0,5 ml Mikrosomensuspension
3,5 ml Phosphatpuffer (0,1 M) pH 7,4
10 ul Isocitrat-Dehydrogenase

Nach fünf Min. Vorinkubation wurde der Ansatz zu gleichen Teilen in Meß- u. Referenzküvette des Unicam-Spektrophotometer SP 1800 gefüllt u. die Reaktion durch Zugabe von 20 ul 10 mM NADP-Na in die Meßküvette gestartet. Bei 420 nm schrieb ich im Differenzspektrum die Bildungsgeschwindigkeit von p-Nitrophenol mit u. erhielt mit dem molaren Extinktionskoeffizienten 3,1 $mM^{-1}cm^{-1}$, der aus einer Eichkurve ermittelt wurde, den Umsatz des p-Nitroanisols in nMol/ mg Prot./ min .

2.3.7. Aromatische Hydroxylierung von 2, 4, 6, 7-^{3}H Äthinylöstradiol*

Das 2, 4, 6, 7-^{3}H Äthinylöstradiol wurde nach der von BOLT et al. (4) beschriebenen Methode aus 2, 4, 6, 7-^{3}H Östron (NEN Corporation Ltd. Frankfurt) durch Äthinylierung an C 17 hergestellt, damit durch den 17 a-Alkyl-Substituenten die Hydroxylierung an C 16 verhindert wird. Unter diesen Voraussetzungen läuft die Hydroxylierung hauptsächlich an C 2 u. C 4 neben einer geringen Rate an C 6 u. C7 ab. Der Ansatz in Eppendorf-Mikrogefäßen enthielt:

0,2 ml 2,4,6,7-^{3}H Äthinylöstradiol (200 nMol = 800 ng Atom ^{3}H) eingedampft
0,1 ml $MgCl_2$ (0,05 M)
0,1 ml DL-Na-Isocitrat (0,08 M)
0,4 ml Tris-HCl-Puffer (0,25 M) pH 7,4
0,3 ml Mikrosomensuspension
5 ul Isocitrat-Dehydrogenase

Mit einer Proteinkonzentration von 2,5-3,5 mg/ml im Ansatz wurde bei 37° C fünf Min. vorinkubiert u. dann

*Gebräuchlicher Trivialname
Äthinylöstradiol: 17 a-Äthinyl-1,3,5(10)-östratien-3,17ß-ol

die Reaktion mit 0,1 ml 0,01 M NADP-Na gestartet. Nach 3, 6, 9 u. 12 Min. entnahm ich jeweils 0,2 ml dem Inkubat u. fällte es in 0,4 ml 7,5 %iger Trichloressigsäure aus. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins destillierte ich 0,5 ml des Überstandes mit 4,5 ml H_2O unter Vakuum.

Zur Radioaktivitätsmessung wurde der von BRAY (5) beschriebene Szintillator modifiziert vorwendet:
7 gr. 2, 5-Diphenyloxazol u. 100 gr. Naphthalin ad 1000 ml Dioxan gelöst.
1 ml des Destillats wurde mit 10 ml Szintillator versetzt u. die Impulse im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen u. anhand mitbestimmter Standards umgerechnet in nMol/mg Prot./min .

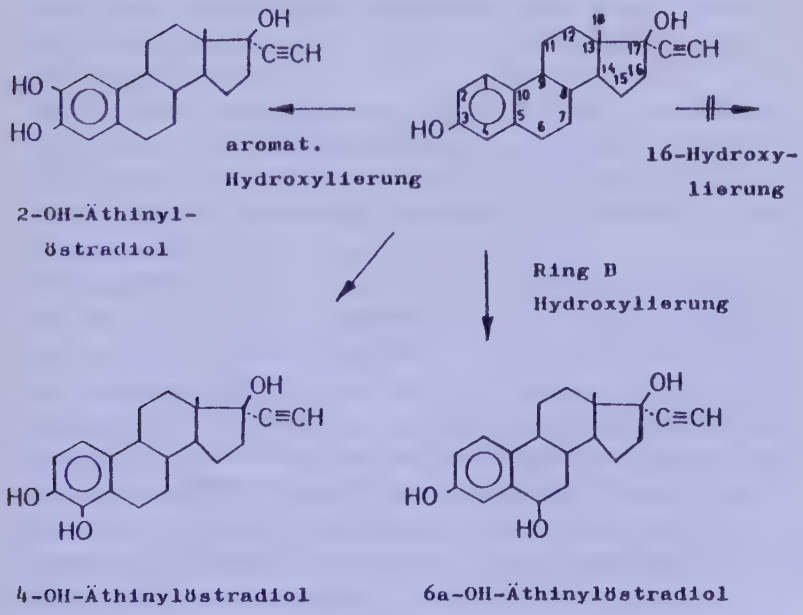

Abb. 1: Oxidativer Metabolismus des Äthinylöstradiols

2.3.8. Hexobarbitalbindungsspektrum mit mikrosomalen Cytochromen

Mit der Meerschweinchengruppe, die mit 25 mg/kg Kgew. Rifampicin vorbehandelt wurde, bestimmte ich das Hexobarbitalbindungsspektrum. 1 ml Mikrosomensuspension u. 5 ml SVT-Pufferlösung pH 7,4 wurde zu gleichen Teilen in Meß- u. Referenzküvette des Unicam-Spektrophotometer SP 1800 gegeben. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von 20 ul Hexobarbital (Evipan^{R})-Lösung in die Meßküvette schrieb ich das Differenzspektrum im Bereich von 360-520 nm mit u. fand dabei einen Anstieg der Absorption bei 388 nm u. einen Abfall bei 421 nm . Mit der Extinktion von der mit geschriebenen Nullinie bis zum Maximum bei 388 nm berechnete ich dE/mg Prot./min .

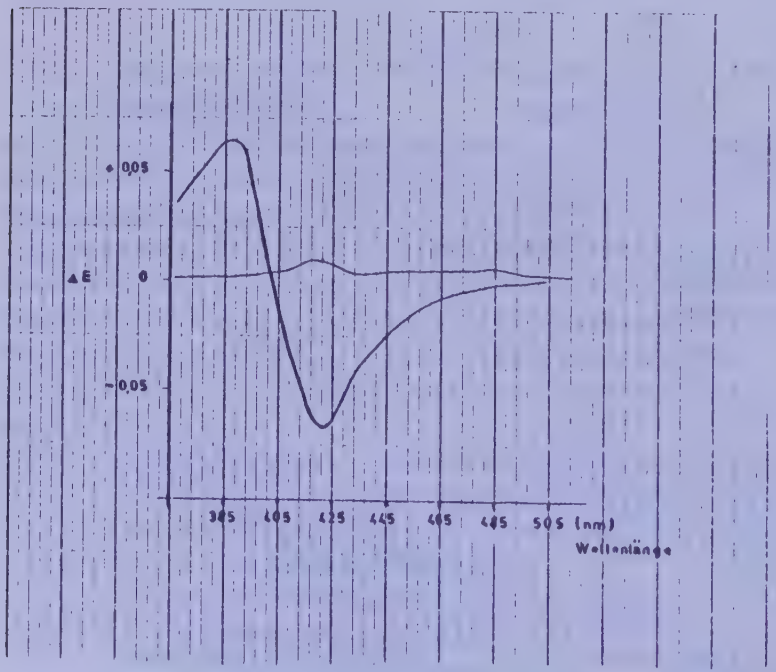

Abb. 2: Hexobarbitalbindungsspektrum eines mit 25 mg/kg Kgew. Rifampicin vorbehandelten Meerschweinchen.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Versuche mit Meerschweinchen

Wie Tabelle 4 zeigt, konnte bei allen Meerschweinchen im Laufe der Vorbehandlung eine Abnahme des Körpergewichtes festgestellt werden, die im allgemeinen 15-25 % des Ausgangsgewichtes betrug u. sich noch deutlicher im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte, die im gleichen Zeitraum eine Zunahme des Körpergewichtes um 10-20 % zu verzeichnen hatten. Es ist möglich, daß die Wirkung des Rifampicins auf die Darmflora dabei eine gewisse Rolle ähnlich der anderer Antibiotika spielt. Andere Faktoren sind sicher auch an der starken toxischen Wirkung beteiligt.

Das Lebergewicht war bei den vorbehandelten Tieren bei makroskopisch unauffälliger Leber so vermindert, daß sogar das Lebergewicht bezogen auf das Körpergewicht um 20-40 % significant geringere Werte ergab als bei den Kontrolltieren.

Bei den mit 10 mg/kg Kgew. vorbehandelten Tieren fand ich einen um 50 % significanten Anstieg der NADPH-Cytochrom C-Reduktaseaktivität. Bei den anderen Messungen gab es keinen deutlichen Unterschied zu den Kontrolltieren, wie Tabelle 1 zeigt.

Die Applikation von 25 mg/kg Kgew. Rifampicin steigerte die NADPH-Cytochrom C-Reduktion auf das 1,5 fache. Cytochrom P 450 u. die aromatische Hydroxylierungsrate des markierten Äthinylöstradiols blieben gleich. Die P-Hydroxylierung des Anilins u. die Demethylierung von Äthylmorphin u. p-Nitroanisol waren um 10-20 % geringer als bei der Kontrollgruppe. Die Messung des Hexobarbitalbindungsspektrums ergab keinen Anhalt für eine erhöhte Cytochrom P 450-Konzentration in der Mikrosomensuspension bei der 1. Versuchsserie.

Die Gruppe der Meerschweinchen, die mit 50 mg/kg Kgew. Rifampicin vorbehandelt wurde, zeigte eine um mehr als

das Doppelte gesteigerte NADPH-Cytochrom C-Reduktase-aktivität. Cytochrom P 450 war um 20 % significant vermehrt, während das Cytochrom b-5 gleichblieb. Die P-Hydroxylierung von Anilin, die aromatische Hydroxylierung des markierten Äthinylöstradiol u. die Demethylierung von Äthylmorphin u. p-Nitroanisol zeigten eine Abnahme um 20-40 %. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die Werte bei den Kontrolltieren.
Die eindrucksvolle Gewichtsabnahme bei den mit 50 mg/kg Kgew. Rifampicin über sechs Tage vorbehandelten Meerschweinchen veranlaßte mich, bei einem Versuch nur drei Tage lang 50 mg/kg Kgew. Rifampicin zu verabreichen.Die Ergebnisse dieses Versuches unterschieden sich nicht wesentlich von dem Versuch mit sechstägiger Vorbehandlung, wie aus den Tabellen 1 u. 2 ersichtlich ist. Beide Versuchsserien mit Meerschweinchen ergaben ähnliche Resultate.

3.2. Ergebnisse der Versuche mit Wistar-Ratten

Im Gegensatz zu den Meerschweinchen hatte Rifampicin bei den Wistar-Ratten keinen Einfluß auf das Körper- u. Lebergewicht. Auch bei höchster Dosierung des Rifampicins kam es nicht zu einem Anstieg von Cytochrom P 450 u. zu einer Abnahme der Demethylierungsrate von Äthylmorphin wie bei den Meerschweinchen. Dagegen nahm die aromatische O-Hydroxylierung des markierten Äthinylöstradiols um 40 % zu. Vorbehandlung mit 50 mg/kg Kgew. hatte bei den Ratten keine stärkere Wirkung als Gaben von 25 mg/kg .

4. Diskussion

Die erstaunliche Vermehrung von Cytochrom P 450 in der menschlichen Leber, wobei es zu einem 2-4 fachen Anstieg unter Rifampicinbehandlung kommt, ließ sich in den Versuchen mit Meerschweinchen u. Wistar-Ratten nicht reproduzieren. OTANI u. REMMER (13) waren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen bei Mäusen u. Ratten. Gleiche Beobachtungen machten PESSAYRE u. MAZEL (14) bei ihren Untersuchungen mit Ratten, während sie bei Mäusen einen significanten 50 %igen Anstieg des Cytochrom P 450 berichteten.

Bei der Studie von REMMER u. Mitarb. (16) wurde trotz des erstaunlich hohen Cytochrom P 450 kein Anstieg der Hydroxylierungsrate von Aminopyrin in vivo unter Rifampicingabe beim Menschen gefunden. Dagegen hatten BOLT et al. (3) einen vierfachen Anstieg der aromatischen O-Hydroxylierung von Äthinylöstradiol bei mit Rifampicin behandelten Patienten im Leberpunktat zu verzeichnen. In weiteren Untersuchungen (unveröffentlicht) konnten diese Autoren den Befund in vivo bestätigen. Dieses Verhalten ließ BOLT u. Mitarb. annehmen, daß es sich um eine bestimmte Form von Cytochrom P 450 handelt, welche für die aromatische O-Hydroxylierung von Äthinyl-Östradiol verantwortlich ist u. durch Rifampicin induziert werden kann.

Wenn bei der Ratte keine Veränderung des mikrosomalen Enzymsystems unter Rifampicin auftrat, so könnte das als Hinweis dafür gelten, daß bei der Ratte eine Form von Cytochrom P 450, die durch Rifampicin induzierbar ist, nicht vorhanden ist. Die unveränderte Demethylierungsrate von Äthylmorphin u. der 30-40 %ige Anstieg der aromatischen O-Hydroxylierung des markierten Äthinylöstradiols bei den mit Rifampicin vorbehandelten Ratten bestärkt die Vermutung, daß Unterschiede bestehen in der Enzymstruktur der mischfunktionellen Oxidasen, die die Oxidation von Anilin, p-Nitroanisol u. die

Demethylierung von Äthylmorphin einerseits katalysieren u. der Östrogenorthooxidase andererseits.
Anhand der Daten von BINDA et al. (1) kann bei einer Dosierung von 50 mg/kg Kgew. Rifampicin eine Konzentration in der Rattenleber von 0,4-0,5 mM erwartet werden. Ähnlich hohe Konzentrationen könnten in der Leber von Meerschweinchen gefunden werden. Es läßt sich allerdings bei den erheblichen Differenzen im Arzneimittelabbau eine solche Aussage nicht mit Sicherheit machen.

Etwas anders als die Wistar-Ratten verhielten sich die Meerschweinchen,u. deshalb wurden die meisten Versuche mit dieser Tierspezies durchgeführt. In einem Dosierungsbereich der auch therapeutisch Verwendung findet, kam es zu einem 20-30 %igen Anstieg von Cytochrom P 450 u. zu einem über 100 %igen Anstieg der NADPH-Cytochrom C-Reduktaseaktivität. Der 3-fache Anstieg der NADPH-Cytochrom C-Reduktaseaktivität wirkt sich günstig aus, weil dadurch mit BOLT u. H. REMMER (2) die Leberzelle vor dem Anstieg reaktiver Rifampicin-Quinone geschützt wird, die nach SUNAHARA et al. (20) als Metaboliten des Rifampicins durch Autoxidation unter in vivo-Bedingungen entstehen können u. durch die NADPH-Cytochrom C-Reduktase wieder zu Rifampicin reduziert werden.
In der Tuberkulosetherapie mit Rifampicin kommt es nach BINDA et al. (1) nur in wenigen Fällen zu einem Transaminasenanstieg oder zu einer Cholestase, während beim Meerschweinchen starke toxische Effekte mit vermindertem Leber-Körpergewichts-Quotienten auftraten. Eine Hemmung der Proteinbildung kann dabei nicht alleinige Ursache sein.
Die Ergebnisse bei den Meerschweinchen lassen sich nicht mit denen von JEZEQUEL et al. (6) vereinbaren, die bei einer Dosierung von 80 mg/kg Kgew. Rifampicin keine Gewichtsbestimmungen durchführten u. eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums elektonenmikro-

skopisch im Meerschweinchen-Hepatocyten gefunden hatten. Allerdings kann aus morphologischen Veränderungen nicht auf eine gesteigerte Aktivität der arzneimittelabbauenden Enzyme geschlossen werden, denn es könnte sich auch um ein hypertrophisch-hypoaktives endoplasmatisches Retikulum handeln, wie es von POPPER u. SCHAFFNER (15) bei intrahepatischer Cholestase gefunden wurde.
Warum gerade Rifampicin beim Meerschweinchen toxisch wirkt, bleibt rätselhaft. Eine genaue Analyse der toxischen Wirkung steht noch aus. Es ist möglich, daß Bedingungen in der Leber von Meerschweinchen vorherrschen, welche die Entstehung von toxischen Metaboliten begünstigt. Jedenfalls ist es sehr merkwürdig, daß gleiche Dosen beim Menschen nicht ähnliche toxische Erscheinungen hervorrufen.
Die Tierspezies Meerschweinchen u. Wistar-Ratte sind nach diesen Ergebnissen nur bedingt tauglich, um die Induktionseffekte, die beim Menschen gefunden wurden, im Experiment unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Die Ergebnisse verdeutlichen aber die Notwendigkeit, die speziesspezifischen Enzymstrukturen in ihrer Verschiedenartigkeit zu erfassen u. die Möglichkeit zu erforschen, wie man am besten die verschiedenen Formen von Cytochrom P 450 trennen u. auf ihre Induzierbarkeit untersuchen kann.

5. Zusammenfassung

1. Körpergewicht u. noch stärker das Lebergewicht zeigen nach sechstägiger Vorbehandlung mit Rifampicin bei Meerschweinchen eine deutliche Abnahme, hingegen nicht bei Wistar-Ratten.

2. In einem Dosierungsbereich von 10-50 mg/kg Kgew. Rifampicin waren beim Meerschweinchen ein bis zu 20 %iger Anstieg des Cytochrom P 450 u. ein mehr als zweifacher Anstieg der NADPH-Cytochrom C-Reduktaseaktivität dosisabhängig festzustellen. Cytochrom b-5 blieb im Bereich der Kontrollgruppe, während alle anderen Parameter ebenfalls dosisabhängig deutlich geringere Werte aufwiesen, wie Tab. 1 u. 2 zeigen.

3. Nach Vorbehandlung mit 25 u. 50 mg/kg Rifampicin wurde bei den Wistar-Ratten außer einem dosisunabhängigen 30-40 %igen Anstieg der aromatischen Hydroxylierung des markierten Äthinylöstradiols kein Anstieg oder Abfall der Oxidation anderer Arzneimittel beobachtet. (siehe Tab. 3).

4. Meerschweinchen, Ratte u. Maus reagieren nach Vorbehandlung mit Rifampicin nicht wie der Mensch, bei dem ein ungewöhnlich hoher Anstieg des Cytochrom P 450 u. der Hydroxylierungsrate von Äthinylöstradiol gefunden wird.

6. Tabellen

6.1. Tab. 1: Bestimmung der arzneimittelabbauenden Enzyme in der Meerschweinchenleber nach 6-tägiger Vorbehandlung mit Rifampicin (1. Versuchsserie).

in vitro-Bestimmungen	Kontroll-tiere (n = 16)	Rifampicin 10 mg/kg (n = 4)	Rifampicin 25 mg/kg (n = 5)	Rifampicin 50 mg/kg *) (n = 7)
gr Lebergew./ 100 gr Kgew.	3,68 ± 0,46	2,36 ± 0,25(3)	2,93 ± 0,33(3)	2,89 ± 0,29(3)
Cytochrom b-5 (nMol/mg Prot.)	0,74 ± 0,10	0,77 ± 0,07(1)	0,65 ± 0,06(1)	0,75 ± 0,16(1)
Cytochrom P450 (nMol/mg Prot.)	1,44 ± 0,14	1,51 ± 0,15(1)	1,58 ± 0,19(1)	1,79 ± 0,19(3)
NADPH-Cytochrom C-Reduktase	35,33 ± 6,57	52,14 ± 3,77(3)	55,42 ± 4,88(3)	87,39 ± 8,49(3)
P-Hydroxylierung von Anilin	1,79 ± 0,11	1,77 ± 0,06(1)	1,58 ± 0,12(2)	1,45 ± 0,08(3)
Demethylierung von Äthylmorphin	1,46 ± 0,13	1,23 ± 0,08(2)	1,26 ± 0,12(2)	0,96 ± 0,14(3)
Demethylierung von p-Nitroanisol	4,85 ± 0,53	4,36 ± 0,47(1)	4,09 ± 0,10(2)	4,07 ± 0,54(2)
Hexobarbitalbin-dungsspektrum (dE/mg Prot./ml)	0,03 ± 0,002		0,024 ± 0,006(1)	

Die NADPH-Cytochrom C-Reduktase u. der Umsatz von Anilin, Äthylmorphin u. p-Nitroanisol wurde in nMol/mg Prot./min angegeben.

*) Diese Gruppe wurde abweichend von der Versuchsanordnung nur drei Tage mit Rifampicin vorbehandelt.

(1) $p > 0,05$ (n. s.); (2) $p < 0,05$; (3) $p < 0,01$.

6.2. Tab. 2: Bestimmung der arzneimittelabbauenden Enzyme in der Meerschweinchenleber nach 6-tägiger Vorbehandlung mit Rifampicin(2.Versuchsserie).

in vitro-Bestimmungen	Kontrolltiere (n = 7)	Rifampicin 25 mg/kg (n = 4)	Rifampicin 50 mg/kg (n = 7)
gr Lebergewicht/ 100 gr Kgew.	3,82 ± 0,46	2,85 ± 0,21(3)	3,01 ± 0,27(3)
Cytochrom b-5 (nMol/mg Prot.)	0,69 ± 0,09	0,65 ± 0,09(1)	0,85 ± 0,12(2)
Cytochrom P 450 (nMol/mg Prot.)	1,38 ± 0,17	1,60 ± 0,27(1)	1,89 ± 0,15(3)
NADPH-Cytochrom C-Reduktase (nMol/mg Prot./min)	41,43 ± 4,21	52,00 ± 1,52(3)	84,30 ± 9,14(3)
Demethylierung von Äthylmorphin (nMol/mg Prot./min)	1,51 ± 0,13	1,20 ± 0,13(3)	0,92 ± 0,02(3)
Aromat. Hydroxylierung von 2,4,6,7-^{3}H Äthinylöstradiol (nMol/mg Prot./min)	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,07(1)	0,20 ± 0,04(3)

(1) $p > 0,05$ (n.s.); (2) $p < 0,05$; (3) $p < 0,01$.

6.3. Tab. 3: Bestimmung der arzneimittelabbauenden Enzyme in der Rattenleber nach 6-tägiger Vorbehandlung mit Rifampicin.

in vitro-Bestimmungen	Kontrolltiere (n = 8)	Rifampicin 25 mg/kg (n = 4)	Rifampicin 50 mg/kg (n = 5)
gr Lebergewicht/ 100 gr Kgew.	4,18 ± 0,26	4,03 ± 0,05(1)	4,23 ± 0,10(1)
Cytochrom b-5 (nMol/mg Prot.)	0,84 ± 0,14	0,63 ± 0,04(2)	0,81 ± 0,16(1)
Cytochrom P 450 (nMol/mg Prot.)	1,16 ± 0,13	1,24 ± 0,06(1)	1,15 ± 0,16(1)
NADPH-Cytochrom C-Reduktase (nMol/mg Prot./min)	77,89 ± 5,67	64,03 ± 5,13(3)	61,11 ± 6,80(3)
Demethylierung von Äthylmorphin (nMol/mg Prot./min)	4,43 ± 0,53	4,01 ± 0,31(1)	3,94 ± 0,19(1)
Aromat. Hydroxylierung von 2,4,6,7-^{3}H Äthinylöstradiol (nMol/mg Prot./min)	0,86 ± 0,14	1,26 ± 0,07(3)	1,15 ± 0,12(3)

(1) $p > 0,05$ (n.s.); (2) $p < 0,05$; (3) $p < 0,01$.

6.4. Tab. 4: Gewichtstabelle der Meerschweinchen u. Wistar-Ratten in gr .

1. Versuchsserie der Meerschweinchen

	Körpergewicht bei Versuchsbeginn	Versuchsende
Kontrolltiere (n=16)	313 ± 7	341 ± 10
Tiere mit 10 mg (n= 4)	349 ± 12	321 ± 6
Tiere mit 25 mg (n= 5)	313 ± 8	277 ± 7
Tiere mit 50 mg (n= 7)	312 ± 5	271 ± 5 *)

2. Versuchsserie der Meerschweinchen

	Körpergewicht bei Versuchsbeginn	Versuchsende
Kontrolltiere (n=7)	336 ± 14	366 ± 14
Tiere mit 25 mg (n=4)	326 ± 13	283 ± 10
Tiere mit 50 mg (n=7)	344 ± 8	268 ± 10

3. Versuchsserie mit Wistar-Ratten

	Körpergewicht bei Versuchsbeginn	Versuchsende
Kontrolltiere (n=8)	204 ± 4	227 ± 4
Tiere mit 25 mg (n=4)	205 ± 5	225 ± 6
Tiere mit 50 mg (n=5)	202 ± 4	213 ± 7

*) Diese Tiere wurden nur drei Tage mit 50 mg/kg Kgew. Rifampicin vorbehandelt.

7. Literatur

(1) BINDA, G.; DOMENICHINI, E.; GOTTARDI, A.; ORLANDI, B.; ORTELLI, E.; PACINI, B. and FOWST, G.:
Rifampicin, a General Review
Arzneimittel-Forsch. 21, 1907-1977 (1971).

(2) BOLT, H.M. and REMMER, H.:
Implication of rifampicin-quinone in the irreversible binding of rifampicin to macromolecules.
Xenobiotica 6, 21-32 (1976).

(3) BOLT, H.M.; KAPPUS, H. and BOLT, M.:
Effect of rifampicin treatment on the metabolism of oestradiol and 17a-ethinyloestradiol by human liver microsomes.
Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 301-307 (1975).

(4) BOLT, H.M.; KAPPUS, H. and REMMER, H.:
Studies on the metabolism of ethinyloestradiol in vivo and in vitro: The significance of 2-hydroxilation and the formation of polar products.
Xenobiotica 3, 773-785 (1973).

(5) BRAY, G.A.:
A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Analyt. Biochemie 1, 279-285 (1960).

(6) JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. and TECONI, L.T.:
Changes of the smooth endoplasmic reticulum induced by rifampicin in human and guinea-pig hepatocytes.
Gut, 12, 984-987 (1971).

(7) LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDAL, R.J:
Protein measurment with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

(8) MICHOT, F.; DÜRGI, M. und BÜTTNER, J.:
Rimactan(Rifampicin) u. Antikoagulantientherapie.
Schweiz. med. Wschr. 100, 583-584 (1970).

(9) NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantsch reaction.
Biochem. J. 55, 416-421 (1953).

(10) NETTER, K.J.; SEIDEL, G.:
An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes.
J. Pharm. exp. Therapy 146, 61-65 (1964).

(11) NOCKE-FINCK, L; BREUER, H. und REIMERS, D.:
Wirkung von Rifampicin auf den Menstruationszyklus u. die Östrogenausscheidung bei Einnahme oraler Kontrazeptiva.
Dtsch. med. Wschr. 98, 1521-1523 (1973).

(12) OMURA, T. and SATO, R.:
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. biol. Chem. 239, 2370-2374 (1964).

(13) OTANI, G. and REMMER, H.:
Participation of microsomal NADPH-Cytochrom C-Reduktase in the metabolism of rifampicin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., Suppl., 287; R 76 (1975).

(14) PESSAYRE, D. & MAZEL, P.:
Induction and inhibition of hepatic drug metabolizing enzymes by rifampicin.
Biochem. Pharmacol. 25, 943-949 (1976).

(15) POPPER, H. and SCAFFNER, F.:
Progress in liver diseases Vol. III
The Organelle Pathology of Cholestasis
New-York, London: Grune & Stratton 1970.

(16) REMMER, H.; SCHOENE, B. and FLEISCHMANN, R.A.:
Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver.
Drug Metab. Dispostion 1, 224-230 (1973).

(17) REMMER, H.; GREIM, H; SCHENKMAN, J.B. and ESTABROOK, R.W.:
Methods for the elevation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrom P450.
In: ESTABROOK, R.W. and PULLMAN, M.E.(Eds.):
Oxidation and phosphorylation.
Methods in Enzymology 10, 703-708 (1967).

(18) SCHENKMAN, J.B.; REMMER, H. and ESTABROOK, R.W.:
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal Cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113-123 (1967).

(19) STAUDINGER, H. und LEYBOLD, F.:
Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen.
Biochem. Z. 331, 389- 393 (1959).

(20) SUNAHARA, S. and NAGAKAWA, H.:
Metabolic study and controlled clinical trials of rifampicin.
Chest 61, 526-532 (1972).

(21) WILLIAMS, C.H. and KAMIN, H.:
Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide-Cytochrom C-Reduktase of liver.
J. biol. Chem. 237, 587-595 (1962).

L E B E N S L A U F

Am 8. August 1950 wurde ich, Fritz Stohrer, als Sohn des Kaufmanns Friedrich Stohrer u. seiner Ehefrau Klara geb. Hanne in Göppingen geboren.
Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Uhingen u. danach die Realschule in Göppingen. Nach dem Schulabschluß mit der Mittleren Reife im November 1966 begann ich parallel zu meiner Lehrzeit bei der Firma Gebr. Boehringer in Göppingen als Maschinenschlosser einen Fernlehrgang zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife. Im November 1969 legte ich die Facharbeiterprüfung ab u. im Juli 1971 in Stuttgart die Reifeprüfung für Schulfremde.
Nach sechsmonatigem Grundwehrdienst bei der Bundeswehr begann ich zum Sommersemester 1972 das Medizinstudium an der Universität Göttingen. Im Frühjahr 1974 wechselte ich nach bestandenem Physikum an die Universität Tübingen über u. legte dort am 16. Oktober 1978 die ärztliche Prüfung ab.